

Approved For Release STAT  
2009/08/19 :  
CIA-RDP88-00904R000100120

Dec

Approved For Release  
2009/08/19 :  
CIA-RDP88-00904R000100120



Вторая Международная конференция  
Организации Объединенных Наций  
по применению атомной энергии  
в мирных целях

A/CONF/15/P2079  
USSR  
ORIGINAL:RUSSIAN

Не подлежит оглашению до официального сообщения на Конференции

СПЕКТРЫ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА ОБЛУЧЕННЫХ  
АМИНОКИСЛОТ, ПЕПТИДОВ, БЕЛКОВ И ЛИОФИЛИЗОВАННЫХ ТКАНЕЙ

Л. А. Блюменфельд, А.Э. Калмансон

Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) свободных радикалов, возникающих в биологических объектах под действием ионизирующего излучения были впервые изучены в 1955 году в США Горди, Ардом и Шилдсом [1] и Комбриссоном и Уберсфельдом [2] во Франции. В этой и последующих работах [3] Горди с сотрудниками описали и интерпретировали спектры ЭПР ряда аминокислот, пептидов, белков, гормонов, витаминов и нуклеиновых кислот после рентгеновского облучения (50 кВ).

В настоящей работе мы провели систематическое исследование спектров ЭПР свободных радикалов, возникающих в сухих препаратах биологических объектов после облучения  $\gamma$ -лучами  $\text{Co}^{60}$  дозами порядка  $10^5 - 10^7$  р. Были изучены следующие вещества: гликоля, аланин, валин, лизин, серин, гистидин, тирозин, триптофан, фенилаланин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, норлейцин, глицил-глицин, глицил-тирозин, глицил-лейцин, глутатион, трипсин, трипсиноген, нативный и денатурированный пепсин, нативный и денатурированный казеин, нативный и денатурированный оксигемоглобин, нативный и денатурированный ихтиокол, актомиозин, лиофилизированные ткани (нативные и денатурированные препараты) печени крысы, селезенки крысы, сердца крысы, легкого крысы, скелетной мышцы кролика, мозга кролика, почки кролика, а также некоторые другие ткани, лиофилизированные и облученные в нативном состоянии и после предварительной тепловой денатурации различной глубины.

Ни один из перечисленных образцов не давал до облучения сигналов ЭПР.

25 YEAR RE-REVIEW

— 2 —

Для проверки некоторых расхождений, обнаруженных между нашими данными и данными Горди с сотрудниками, были дополнительно изучены спектры ЭПР некоторых белковых препаратов после рентгеновского облучения (60 кВ). Во всех случаях, кроме тех, где это специально не оговорено, облучение производилось в вакууме.

Для получения спектров ЭПР мы использовали спектрометр, собранный на двойном Т-мосте по простой отражательной схеме с глубокой магнитной модуляцией (50 Гц). После детектирования на кремниевом полупроводниковом диоде и усиления широкополостным усилителем сигнал поступал на вертикальные пластины электронного осциллографа, горизонтальная развертка которого была синхронизована с частотой модуляции магнитного поля. Образец помещали в цилиндрический объемный резонатор, возбуждаемый волной типа  $H_{111}$ , в пучность магнитной составляющей высокочастотного поля. Кривую ЭПР фотографировали с экрана осциллографа. Измерение интегральной интенсивности сигналов ЭПР производили путем сравнения площадей кривых поглощения исследуемого образца и стандартного сигнала стабильного свободного радикала дифенилпикрилгидразила. Абсолютная чувствительность установки по дифенилпикрилгидразилу соответствовала  $10^{-9}$  М свободных радикалов.

Исследование спектров ЭПР биологических объектов было задумано нами, как продолжение работы по спектрам ЭПР белковых систем, замороженных и лиофилизированных в момент протекания ферментативного процесса [4], впервые обнаруженных Коммонером, Таунсендом и Пейком в 1954 году [5].

Чрезвычайная узость сигналов ЭПР и отсутствие сверхтонкой структуры (рис. I) свидетельствовали о значительной делокализации неспаренных электронов в белковой молекуле. Было показано, что при торможении ферментативного процесса в результате мягкой денатурации или вследствие израсходования субстратов, линии ЭПР не обнаруживаются. Эти данные позволили утверждать, что наблюдаемый эффект обусловлен неспаренными электронами, принадлежащими белковым структурам, а не ионам металлов или другим парамагнитным примесям. Энергия возбуждения белковой молекулы в триплетное состояние слишком велика, чтобы можно было ожидать появления сколько-нибудь заметного количества неспаренных электронов при обычных температурах. Наблюдаемый эффект можно было гипотетически объяснить тем, что собственные электронные уровни субстрата, образующего временный комплекс с ферментом (например в процессах тканевого дыхания), располагаются либо вблизи

— 3 —

возбужденного, либо вблизи основного электронного уровня белка. В зависимости от осуществления первого, второго или обоих из указанных выше случаев комплексы субстрат - фермент, простетическая группа - апофермент и т.д. можно считать примесными полупроводниками с электронной, дырочной или смешанной проводимостью. Согласно этому предположению наблюдаемые с помощью метода ЭПР неспаренные электроны в белковых системах принадлежат белкам и делокализованы по белковым молекулам, но имеют примесное происхождение. Было предположено, что миграция электронов или дырок происходит по водородно-пептидным цепочкам поперек главных полипептидных цепей.

Получить электроны в "зоне проводимости" белковой молекулы можно и другим способом, а именно с помощью ионизирующего излучения.

Для этой цели, собственно, и было предпринято настоящее исследование. Однако его результаты, с нашей точки зрения, представляют интерес для выяснения механизма непосредственного воздействия ионизирующего излучения на нативные белковые структуры.

Облученные сухие препараты аминокислот дают, как правило, интенсивные спектры ЭПР с шириной в десятки и сотни гауссов и с ярко выраженной сверхтонкой структурой за счет взаимодействия неспаренного электрона с протонами образующихся свободных радикалов. При дозе  $\sim 10^{-7}$  Р выход свободных радикалов составляет около  $10^{19}$  парамагнитных частиц на грамм образца. В ряде случаев наблюдаемая сверхтонкая структура поддается более или менее однозначной структурной интерпретации. Для тех облученных аминокислот, которые были исследованы ранее Горди с сотрудниками, мы получили совпадающие результаты.

На рисунках 2-7 приведены в качестве примеров спектры ЭПР некоторых облученных аминокислот. Обращает на себя внимание сглаживание сверхтонкой структуры в случае фенилаланина, обусловленное, по-видимому, сильным межмолекулярным обменным взаимодействием (аналогичный результат был получен и для тирозина). Интересно отметить, что облученные аминокислоты фенилаланин, тирозин, триптофан и гистидин характеризуются интенсивной флуоресценцией в видимой области спектра при ультрафиолетовом облучении. Так, например, фенилаланин и гистидин дают желтую флуоресценцию, триптофан - розовую, а тирозин - оранжевую. До облучения вышеперечисленные аминокислоты не давали видимой флуоресценции, кроме триптофана, который характеризуется синей флуоресценцией.

— 4 —

Исследованные нами дипептиды так же, как и аминокислоты, дают после  $\gamma$ -облучения интенсивные сигналы ЭПР со сверхтонкой структурой (рис.8-9).

Следует обратить внимание на симметричный дублет глицил-глицина с расщеплением сверхтонкой структуры около 16 гауссов. Это дублетное расщепление мы, как и Горди с сотрудниками, объясняем локализацией неспаренного электрона у атома кислорода, принимающего участие в межмолекулярной водородной связи ( $\text{C}=\text{O} \dots \text{NH}$ ) между соседними молекулами дипептида в решетке кристалла.

Весьма интересен спектр ЭПР облученного глутатиона (рис.10). Величина  $g$ -фактора центра сигнала (2,024) равна  $g$ -фактору неспаренного электрона, локализованного на атоме серы[6]. Узкий пик у начала кривой поглощения глутатиона (рис.10) — стандартный сигнал дифенилпикрилгидразила.

При исследовании спектров ЭПР облученных нативных белков и лиофилизированных тканей, на 60-80% состоящих из белков, бросаются в глаза две основные особенности. Во-первых, при равной дозе  $\gamma$ -излучения, количества образующихся в белках и тканях свободных радикалов на 3-4 порядка меньше, чем в аминокислотах и пептидах. Во-вторых, сигнал не представляет собой наложения спектров ЭПР отдельных аминокислот, а является, обычно (исключения будут указаны ниже), единственным узким пиком с полушириной от 2 до 6 гауссов, без сверхтонкой структуры. По положению и ширине сигнал обычно неотличим от спектров ЭПР ферментативных препаратов, замороженных и лиофилизированных в момент протекания ферментативных процессов. Иногда (нативный оксигемоглобин, ихтиокол, трипсин) интенсивность сигналов была настолько мала, что они не поддавались фоторегистрации на нашем приборе. В качестве примеров на рис.11-17 приведены спектры ЭПР некоторых нативных лиофилизированных препаратов.

Что касается узости наблюдаемых линий ЭПР и отсутствия сверхтонкой структуры, то в связи с чрезвычайно малой концентрацией неспаренных электронов ( $10^{-7}$ - $10^{-8}$  М/г), этот эффект нельзя объяснить обменным взаимодействием. Приходится принять трансляционный механизм сужения[7]. Рассмотрим вопрос об интенсивности сигналов. В случае аминокислот и пептидов наблюдаемый сигнал обусловлен положительными ион-радикалами, т.е. "дырками" с неспаренными электронами. Выбитые электроны застревают в узлах кристаллической решетки и, как указывает Горди с сотрудниками, дают настолько широкие линии ЭПР, что обусловленный ими общий фон поглощения удается обнаружить лишь в нескольких



— 5 —

случаях. Можно предположить, что в нативных белковых структурах большинство выбитых  $\gamma$ -квантами электронов застревает в непосредственной близости от "каналов проводимости", по которым возвращается к дыркам. Лишь небольшая часть выбитых электронов попадает в глубокие потенциальные ямы в узлах решетки твердого тела, откуда они не могут вернуться в зону проводимости. Оставшиеся дырки делокализованы по белковой молекуле и дают узкие одиночные сигналы ЭПР.

Для того, чтобы проверить гипотезу о роли регулярной сетки водородных связей в создании зон проводимости нативных белков, мы исследовали спектры ЭПР белковых препаратов, подвергнутых перед высушиванием и облучением тепловой денатурации. Во всех случаях вместо слабых, узких линий ЭПР появляются интенсивные широкие сигналы с дублетным расщеплением ( $\Delta H \sim 16$  Гс), повторяющие спектр ЭПР облученного глицил-глицина, т.е. характерные для изолированных водородных связей. В качестве примера на рис. 18-21 показаны и спектры ЭПР некоторых препаратов, подвергнутых предварительной тепловой денатурации. Для оксигемоглобина при дозе  $\sim 10^7$  р концентрация свободных радикалов составила приблизительно  $3 \cdot 10^{18}$  частиц на грамм (для нативного препарата концентрация была меньше  $10^{16}$  частиц на грамм). Количество образующихся при облучении свободных радикалов зависит от глубины предварительной денатурации. В случае оксигемоглобина, подвергнутого предварительной денатурации в растворе: а) при  $73^\circ - 2$  мин.; б) при  $100^\circ - 15$  мин.; в) при  $100^\circ - 30$  мин. — интегральные интенсивности сигналов ЭПР соответственно равны (в частицах на грамм): а)  $6 \cdot 10^{16}$ ; б)  $1 \cdot 10^{18}$  и в)  $3 \cdot 10^{18}$ .

Таким образом, число образующихся при облучении свободных радикалов увеличивается в результате предварительной денатурации в 100 — 500 раз.

По-видимому, наблюдаемые эффекты объясняются тем, что в результате тепловой денатурации нарушается вторичная структура белковых молекул и вместо длинных цепочек водородно-пептидных связей возникают хаотически расположенные водородные связи, не образующие единой системы. Благодаря этому уничтожаются "каналы проводимости", по которым выбитые излучением электроны могли бы рекомбинироваться с дырками, и количество образующихся свободных радикалов повышается.

Несколько особняком стоят результаты, полученные для облученного актомиозина и лиофилизованной скелетной мышцы кролика. В этом случае не удается получить одиночного сигнала в "нативном" препарате.

— 6 —

Как правило, получается асимметричный дублет (рис.22). В результате глубокой предварительной тепловой денатурации получается характерный симметричный дублет с расщеплением 16 гауссов (рис.23), а выход радикалов повышается приблизительно на два порядка. Можно думать, что в результате неизбежного сокращения миозиновых нитей при обработке препарата в какой-то степени наступает мягкая денатурация, возможно, обратимая, и нативная белковая структура сохраняется. В цитированных выше работах Горди с сотрудниками [1,3] для большинства нативных белковых препаратов, в том числе и для исследованного нами оксигемоглобина, были получены после рентгеновского облучения дублетные сигналы ЭПР, аналогичные сигналам денатурированных белковых препаратов, приведенных в настоящей работе. При проверке этих результатов, используя в качестве источника излучения рентгеновскую трубку 60 кВ, мы также во всех случаях получили сигналы с дублетной сверхтонкой структурой. Аналогичный результат был получен при очень больших дозах и мощностях  $\gamma$ -облучения. Можно полагать, что в этих случаях происходит частичная денатурация белков под лучом.

Приведенные в настоящей работе данные свидетельствуют в пользу существования зон электронной проводимости в нативных белковых молекулах, обусловленных регулярной сеткой водородных связей.

Результаты, говорящие о пониженном образовании свободных радикалов в нативных белковых структурах под действием ионизирующего излучения, позволяют понять повышенную радиорезистентность нативных белков, обнаруженную химическими методами [18]

Конечно, следует иметь в виду, что в живых организмах действие ионизирующего излучения связано с гораздо более сложными закономерностями, обусловленными образованием больших количеств высокоактивных низкомолекулярных свободных радикалов.

### ВЫВОДЫ

1. Свободные радикалы, образующиеся в результате  $\gamma$ -облучения аминокислот и простых пептидов дают, как правило, интенсивные спектры ЭПР, шириной в десятки эрстедт с характерной сверхтонкой структурой.

2. Нативные белки и лиофилизованные ткани дают после  $\gamma$ -облучения узкие линии ЭПР без сверхтонкой структуры. Выход свободных радикалов понижен по сравнению с аминокислотами на 3-4 порядка.

— 7 —

3. В результате предварительной денатурации  $\gamma$ -облученных белков в их спектре ЭПР появляется сверхтонкая структура и выход радикалов резко увеличивается.

4. Дана структурная интерпретация наблюдаемых эффектов.

### Литература

1. Gordy W., Ard W.B., Shields H.W.,  
Proc.Nat.Acad.Sci., 41, 983, 1955
2. Combrisson J., Uehersfeld J.,  
Compt.Rend.Acad.Sci. (Paris), 258, 1397, 1954
3. Gordy W., Ard W.B., Shields H.W., G.Mo.Cormio,  
Bull.Amer.Physiol.Soc.Ser.II, 1, N24, 199-200, 1956
4. Блименфельд Л.А.,  
Изв.АН СССР. Сер.биологическая № 3, 285, 1957
5. Commoner B., Townsend J., Pake G.W.,  
Nature, 174, 689, 1954
6. Gardner D.M., Fraenkel G.K.,  
J.A.C.S., 78, 3279, 1956
7. Anderson P.W.,  
J.Physiol.Soc.Japan., 9, 316, 1954
8. Павловская Т.Б., Пасинский А.Г., Тр. I-го Всес. совещания по радиационной химии. М., 1957



8

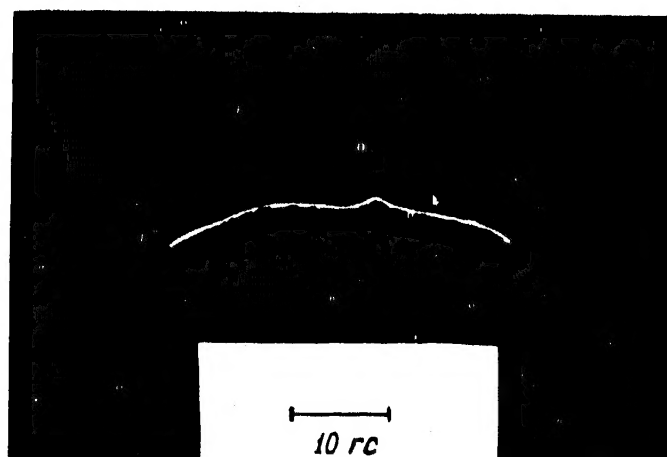


Рис. 1. Спектр ЭПР препарата печени крысы, замороженного и лиофилизованного в момент протекания ферментативных процессов.

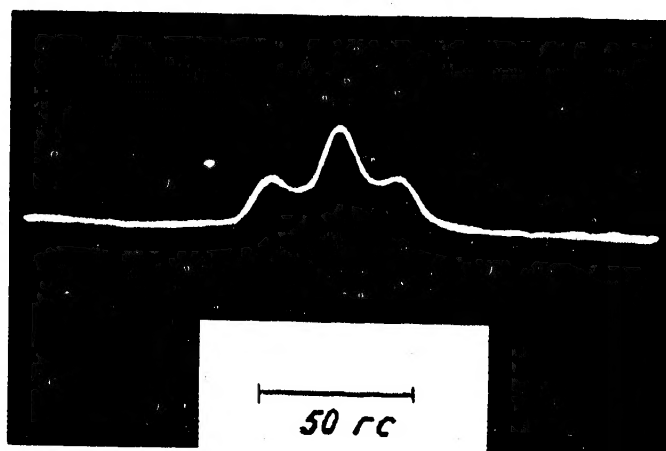


Рис. 2. Спектр ЭПР облученного гликокола.

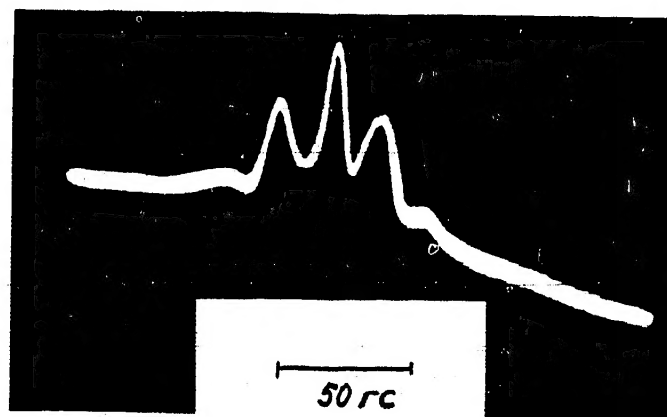


Рис. 3. Спектр ЭПР облученного аланина.

— 9 —

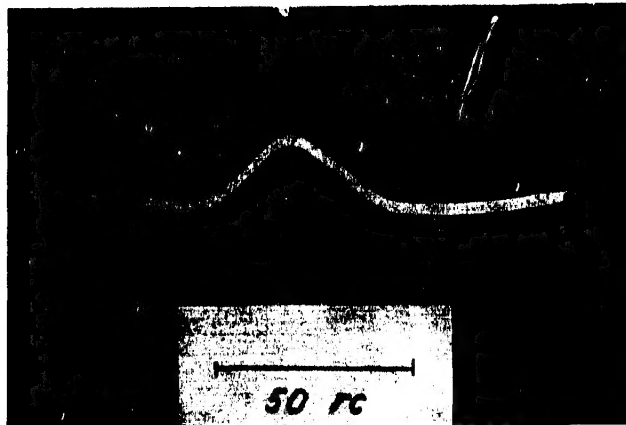


Рис. 4. Спектр ЭПР облученного фенилаланина.

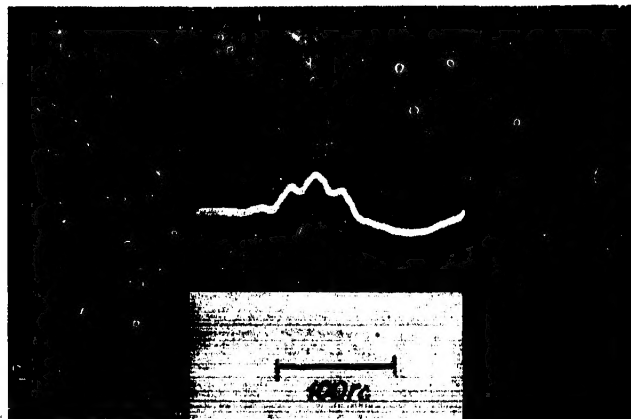


Рис. 5. Спектр ЭПР облученного валина.

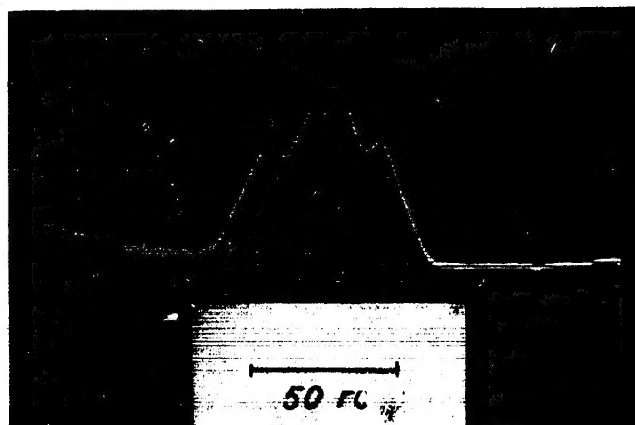


Рис. 6. Спектр ЭПР облученной глутаминовой кислоты.

2584

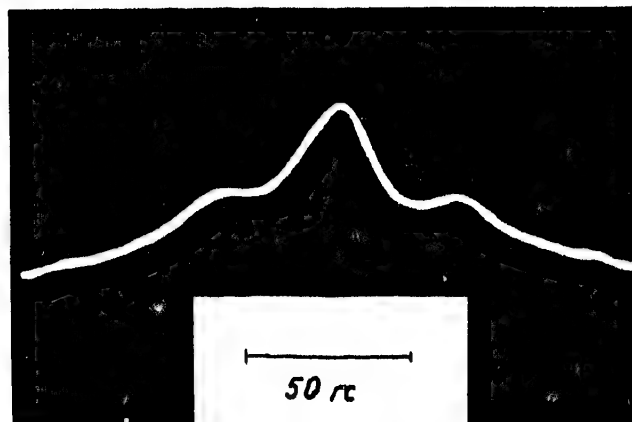


Рис. 7. Спектр ЭПР облученного гистидина.

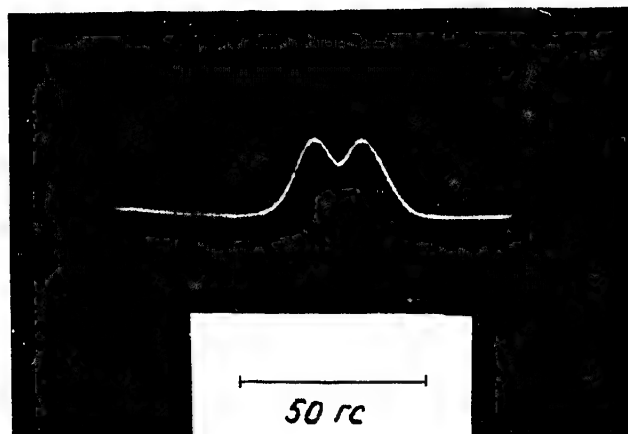


Рис. 8. Спектр ЭПР облученного глицил-глицина.

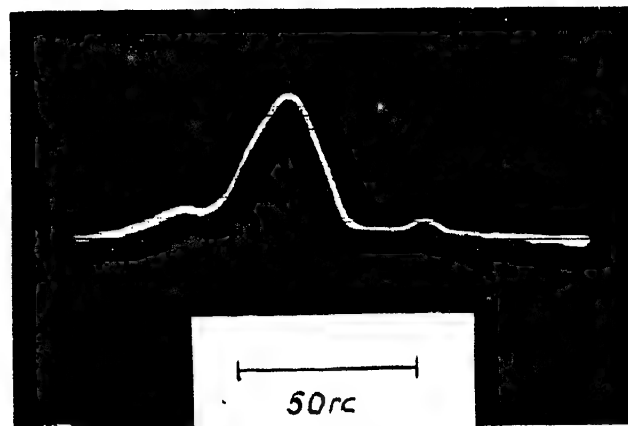


Рис. 9. Спектр ЭПР облученного глицил-тирозина.

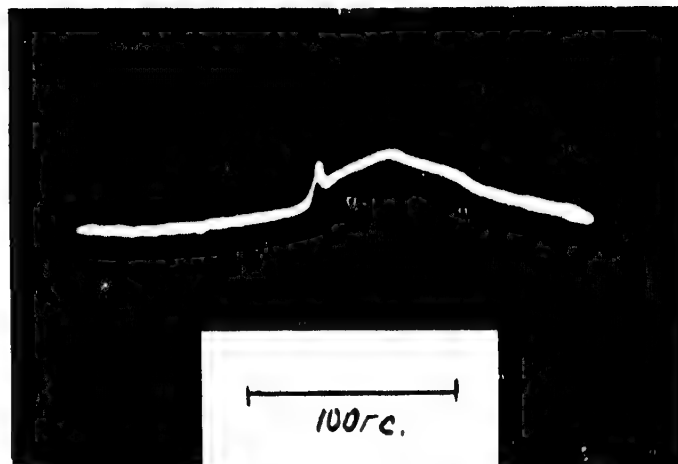


Рис.10. Спектр ЭПР облученного глутатиона.

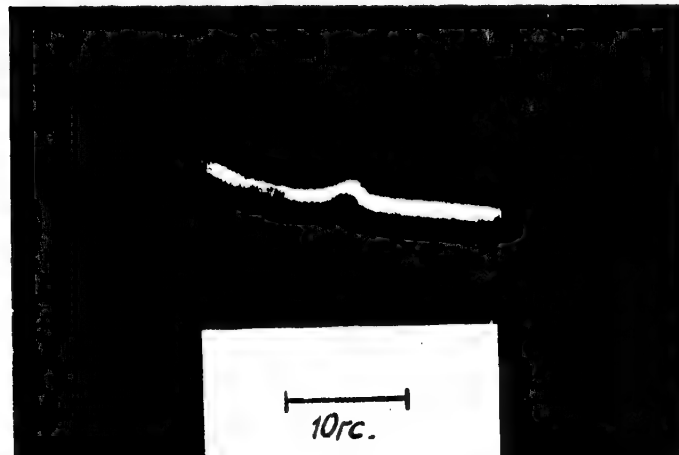


Рис.11. Спектр ЭПР облученной лиофилизованной печени крысы.

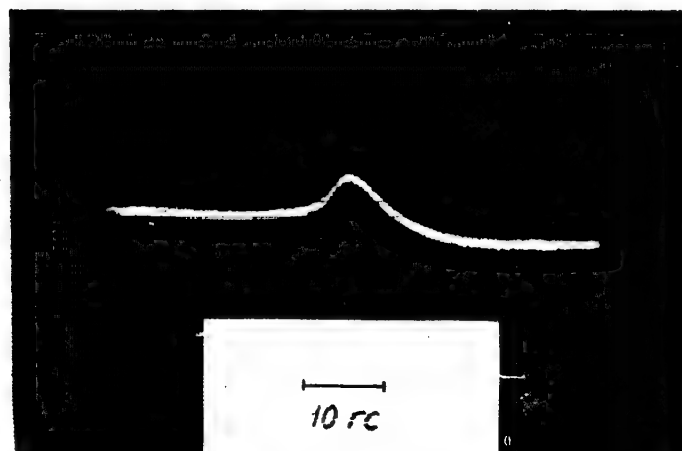


Рис.12. Спектр ЭПР облученного лиофилизованного препарата мозга кролика.

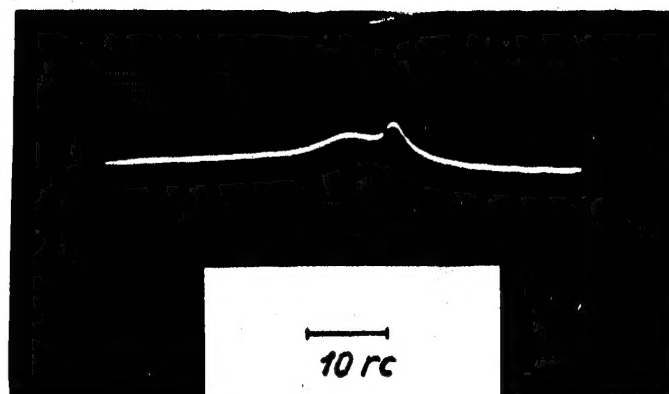


Рис.13. То же, что и рис.12. Рядом виден более острый и несколько более узкий сигнал дифенилпикрилгидразила /полуширина 1,8 Гс/.

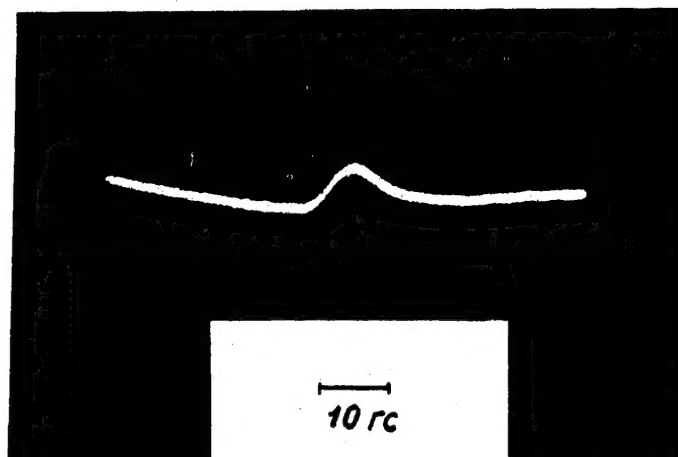


Рис.14. Спектр ЭПР облученного лиофилизованного препарата почки кролика.

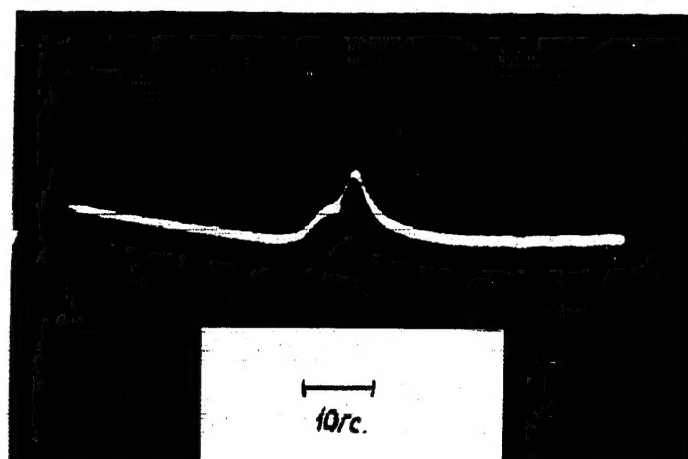


Рис.15. То же, что и рис.13. Рядом сигнал дифенилпикрилгидразила.



- 13 -

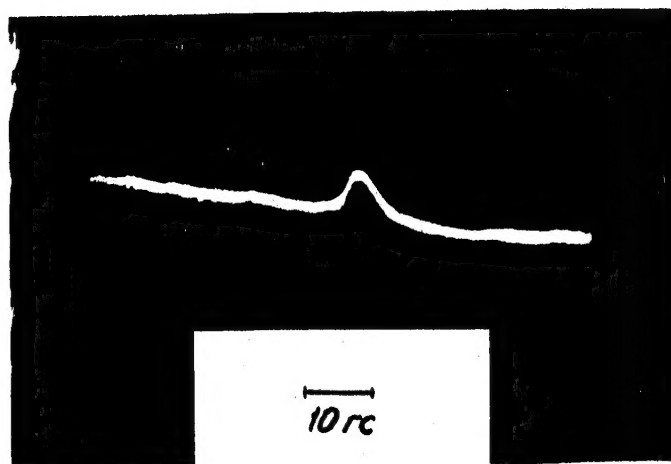


Рис.16. Спектр ЭПР облученного лиофилизованного препарата селезенки кролика.

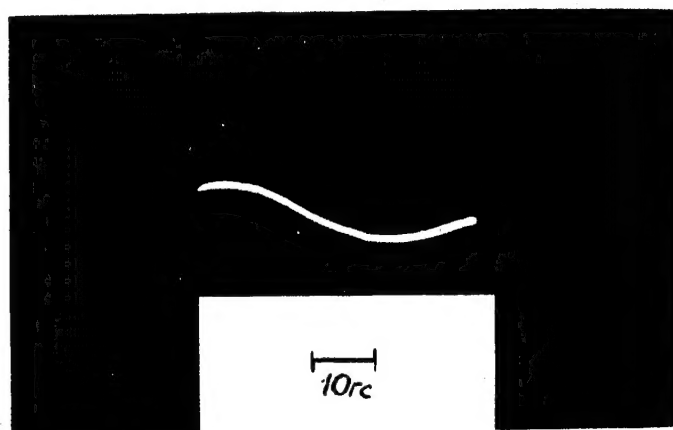


Рис.17. Спектр ЭПР облученного препарата трипсинагена./Сигнал на пределе чувствительности/.

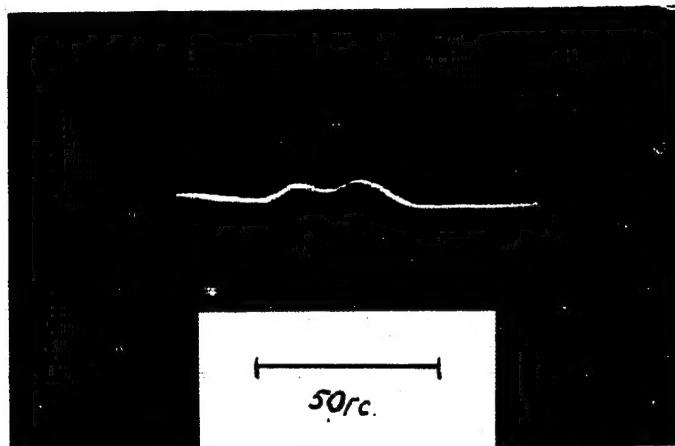


Рис.18. Спектр ЭПР денатурированного оксигемоглобина человека.

4852  
2584

-- 14 --

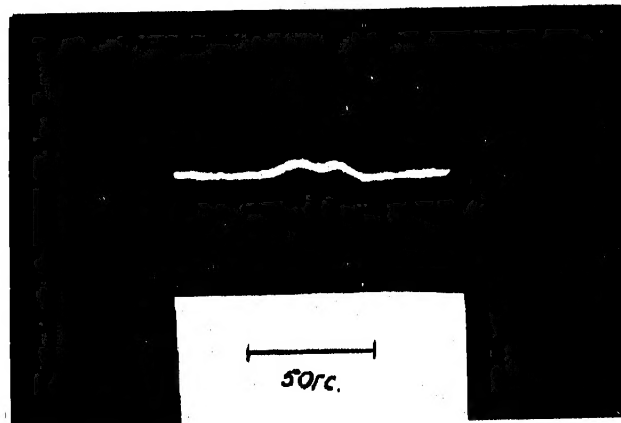


Рис.19. Спектр ЭИП денатурированного ихтиокола.

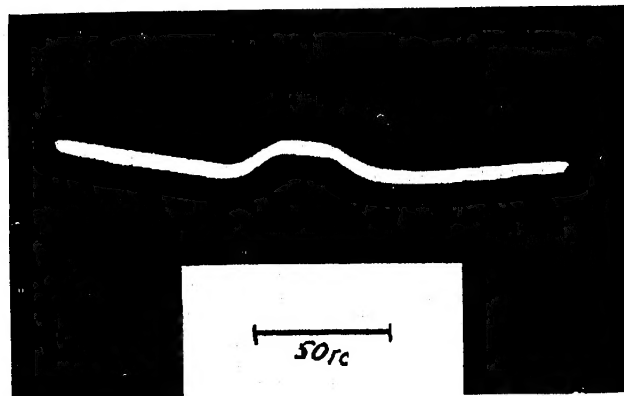


Рис.20. Спектр ЭИП денатурированного кофеина.

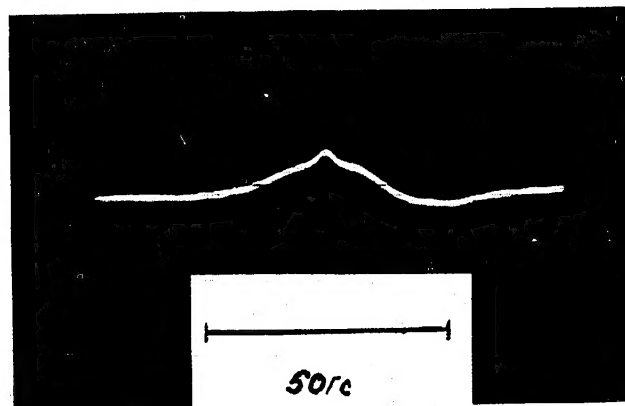


Рис.21. Спектр ЭИП денатурированного препарата почки кролика. В центре дублета виден узкий пик дифенилпикрилгидразила.

15

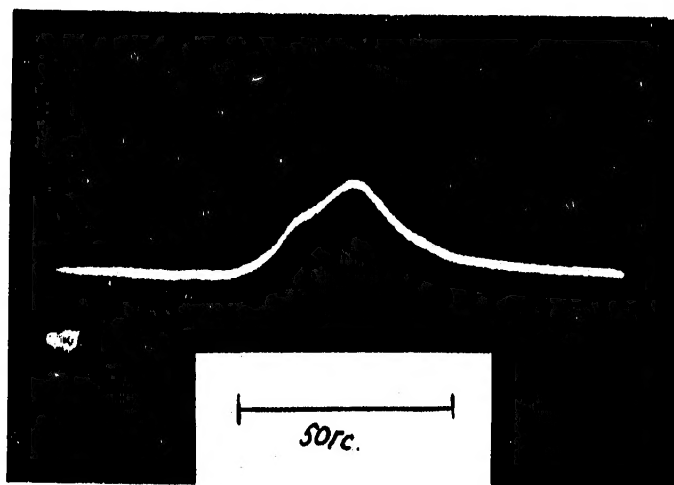


Рис.22. Спектр ЯМР облученной "нестив-  
ной" скелетной мышцы кролика.

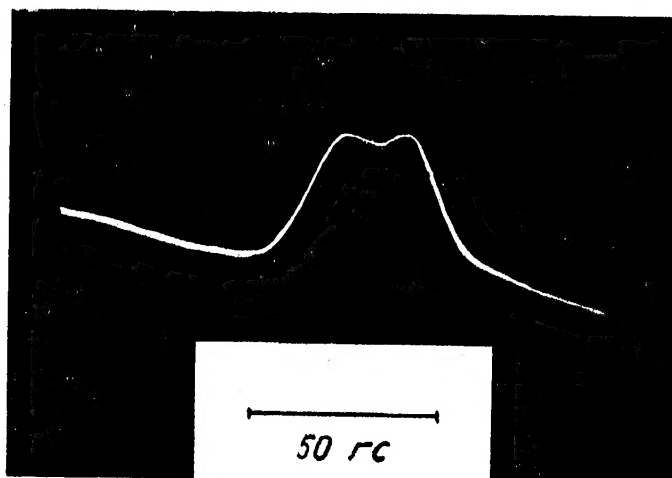


Рис.23. Спектр ЯМР глубоко денатуриро-  
ванной скелетной мышцы кролика.

25.84